



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53801 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 36/02
A61K 38/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСТРАКЦІЇ ПОЛІПЕПТИДІВ ІЗ ТВАРИННОЇ РЕЧОВИНИ

1

(21) u201000489
(22) 19.01.2010
(24) 25.10.2010
(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.
(72) КАЙДАШЕВ ІГОР ПЕТРОВИЧ, ВЕСНІНА ЛЮДМИЛА ЕДУАРДІВНА, СОЛОХІНА ІНГА ЛЕОНІДІВНА
(73) ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ"
(57) Спосіб екстракції поліпептидів із тваринної речовини, що включає зневоднення подрібненого тканинного матеріалу в органічному розчиннику

2

при температурі +4 °С протягом 12-24 годин, екстракцію 3 % оцтовою кислотою в присутності хлориду цинку та магнію при +4 °С протягом 72 годин, преципітацію екстракту, його висушування з наступним розчиненням, фільтруванням та ліофілізацією, який **відрізняється** тим, що як тваринну речовину використовують скелетні м'язи стегна щурів, як органічний розчинник використовується ацетон у співвідношенні 1:10, преципітацію проводять ацетоном у співвідношенні 1:10 при температурі +4 °С протягом 12-24 годин з відмиванням ацетоном та ефіром, ультрафільтрацією поліпептидів через фільтри з діаметром пор 10 кДа.

Запропонована корисна модель відноситься до галузей біології та медицини, до медичної промисловості, а саме до способів отримання біологічно-активних речовин із тваринної сировини та може бути використана для визначення вмісту пептидних речовин у різних тканинах.

В організмі тварин, незалежно від рівня організації, синтезуються пептидні молекули, які виконують сигнальну роль та роль регуляторів різноманітних функцій організму - від окремих функцій спеціалізованих клітин до складних поведінкових актів (Климов П.К., Барашкова Г.М. Эндогенные пептиды как единая система регуляторных веществ //Физиол. журн. им. И.М.Сеченова.- 1993.- Т.79, № 3. - С.80-87). Виконання загальної функції - аутокринної, ендокринної, нейрокринної, паракринної сигнальної передачі інформації дозволило віднести цей клас молекул до регуляторних пептидів (Гомазков О.А. Полифункциональность регуляторных пептидов и правило "что-где-когда" как принцип их упорядоченного действия //Научные доклады высшей школы "Биологические науки".- М.: Высшая школа, 1991.-С.5).

Вперше пептидні біорегулятори багатоклітинних систем було отримано з гіпоталамічної області мозку, епіфізу, тимусу та судинної стінки за допомогою оцтовокислої екстракції в присутності іонів Zn^{2+} , з наступним осаджуванням комплексів поліпептидів ацетоном та очищуванням методом гел'фільтрації для видалення важкорозчинних фракцій

(Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Влияние экстракта из тимуса на процессы заживления ожоговых ран в эксперименте //Эксперим. хирургия и анестезиология. -1974.-№2.-С.49-51. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Писарев О.А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммунорезис //Докл. АН СССР.-1977.-Т.233, №3.-С.491-494. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Выделение, очистки и идентификация иммуномодулирующего полипептида, содержащегося в тимусе телят и человека //Докл. АН СССР.-1981.- Т.261, №1. - С.235-239).

В подальшому були запропоновані та використовувались наступні способи отримання біологічно-активних речовин із тваринної сировини (А.С. №1227198, 1986. Заявка № 3516517/28 от 29.09.82. Способ получения полипептидов. В.Х. Хавинсон, В.Г.Морозов и др.. Золотов Г.К., Дудко В.А., Соколов Г.Е. Патологическая и клиническая оценка эффективности далагина при лечении облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей //Кардиология. - 1990.- Т.30, №7.- С.77-79. А.С. №118782. Заявка №3588257/28-13 от 3.05.83 В.Х. Хавинсон, В.Г.Морозов, Кайдашев И.П. Пути поиска и создания новых лекарственных препаратов естественно существующих пептидных биорегуляторов / В кн.: Биорегуляция и биоэнергетика.- Полтава, 1995.- Вып. 3.- С.20-22. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Перспективы применения цитомединов в клинической

(19) UA (11) 53801 (13) U

кой медицине и геронтологии //Клиническая медицина. - 2000.- № 2.- С. 42-45. Катрушов А.В. Використання нових органоспецифічних поліпептидних препаратів для експериментальної терапії патологій, викликаних пошкоджуючими факторами оточуючого середовища. Автореф. дис. д.мед.н. Київ, 1995.- 40 а).

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб отримання поліпептидів, що включає обробку подрібнених кровеносних судин сільськогосподарських тварин ацетоном у співвідношенні 1:8 протягом 24 годин, екстракцію сировини 3 % розчином оцтової кислоти у присутності хлористого цинку та хлористого магнію, преципітацію ацетоном у співвідношенні 1:8 при температурі +4°C з наступним відмиванням його ацетоном та ефіром, ультрафільтрацією отриманих поліпептидних фракцій через фільтри з діаметром пор 10кДа (Пат. 45251 А Україна, МПК H61K35/30,38/00. Спосіб отримання поліпептидів /Чекаліна Н.І., Кайдашев І.П., Катрушов О.В.; заявники і патентотримувачі Чекаліна Н.І., Кайдашев І.П., Катрушов О.В.- № 2001074761; заявл. 09.07.2001; опубл. 15.03.2002.- Бюл. № 3.).

Недоліком існуючого способу є використання в якості сировини тканин великою рогатої худоби, що не дає можливості дослідити вміст пептидних речовин в тканинах інших тварин, недостатнє співвідношення органічного розчинника до тканин, що призводить до погіршеного зневоднення та преципітації.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб екстракції поліпептидів із тваринної речовини шляхом удосконалення відомого способу, який надасть можливість отримувати пептидні речовини із тканин різних тварин для подальшого дослідження їх характеристик та механізмів секреції.

Поставлену задачу вирішують створенням способу отримання поліпептидів, який включає екстракцію подрібненої сировини (скелетні м'язи тварин) 3 % розчином оцтової кислоти в присутності хлориду цинку та магнію, преципітацію екстракту, висушування преципітату з послідовним його розчиненням, фільтруванням та ліофілізацією, в якому, згідно корисної моделі, в якості сировини використовують тканини м'язів бедра щурів, перед екстракцією сировину обробляють ацетоном у співвідношенні 1:10 протягом 12-24 годин, преципітацію здійснюють ацетоном у співвідношенні 1:10 при температурі +4°C протягом 12-24 годин, з наступним відмиванням ацетоном та ефіром та отриманням пептидів масою до 10кДа після ульт-

рафільтрації через фільтри з діаметром пор 10кДа.

Запропонований спосіб виконують наступним чином:

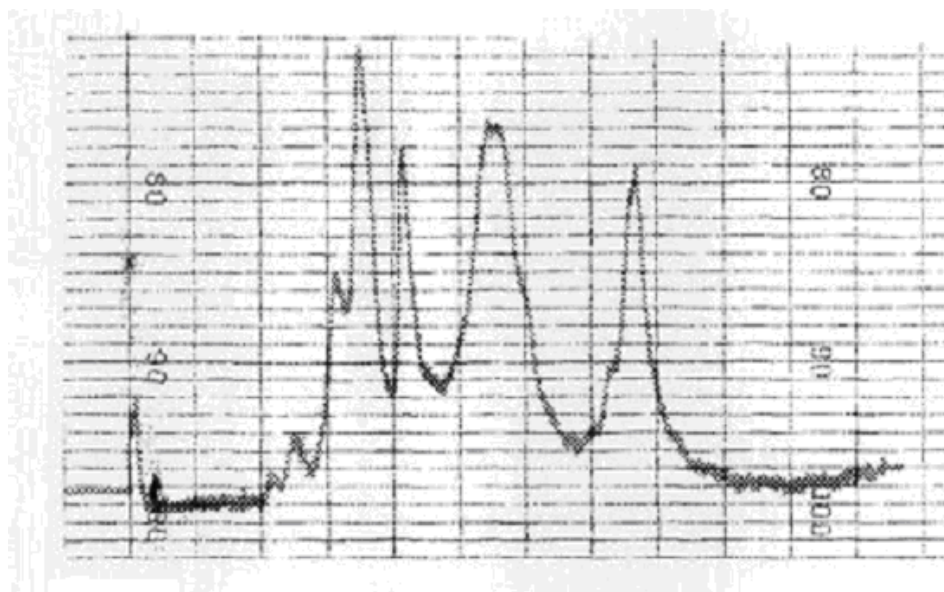
Тканинний матеріал - скелетні м'язи бедра щурів очищують від судин, фасцій та жирової тканини, подрібнюють до консистенції фаршу у ступці на холод, заливають холодним ацетоном у співвідношенні 1:10 та зберігають при +4°C протягом 12-24 годин. Ацетон зливають, тканини висушують постійно помішуючи при кімнатній температурі. Висушені тканини поміщують у екстрагуючий розчин (3 % льодова оцтова кислота з додаванням 0,1 % хлориду цинку та 0,1 % хлориду магнію) у співвідношенні 1:10 при температурі +4°C протягом 72 годин при постійному перемішуванні. Суміш фільтрують через лавсанові та бязеві фільтри при +4°C для видалення дисперсного осаду. Фільтрат обробляють ацетоном у співвідношенні 1:10 при +4°C протягом 12-24 годин. Отриманий преципітат збирають, промивають сумішшю ацетону та ефіру у співвідношенні 1:1 та висушують. Потім розчиняють у підкисленій дистильованій воді та отримують пептиди з молекулярною масою до 10кДа шляхом центрифугування через фільтр з діаметром пор 10кДа.

За допомогою запропонованого способу нами отримано поліпептиди з тканин скелетних м'язів бедра щурів. Аналіз тканинного екстракту проводили за допомогою обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії, яка дає можливість розділення складних сумішей та дослідження речовин тваринного походження, що мають мінімальні відмінності у фізико-хімічних властивостях. Використовували систему SMART tm SYSTEM (LKB, "Pharmacia", Швеція). Колонка mRPC C2/C18, SC=2*1/100, градієнтне подання елюента від 10 до 100% розчину В в розчин А (розчин А: 0,1% розчин трифтороцтової кислоти; розчин В: 0,085% розчин трифтороцтової кислоти у 80% ацетонітрилі) за 80 хвилин, детекція при 214 та 280нм.

Хроматографічний спектр отриманих поліпептидів стегових м'язів наведено на фіг..

Згідно отриманим даним, для пептидів скелетних м'язів характерна наявність добре визначених чотирьох піків, які відповідають часу утримання від 20 до 50 хвилин та достатньо високій оптичній густини при 280 нм.

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє отримувати поліпептидні екстракти з тканин різних тварин для подальшого їх дослідження та визначення фізико-хімічних характеристик та механізмів секреції.



Фіг.